

D-泛解酸内酯水解酶产生菌的筛选及产酶条件研究*

汤一新¹ 孙志浩^{1**} 华 蕾¹ 过鑫富² 汪 军²

(¹ 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

(² 浙江鑫富生化股份有限公司 杭州 311301)

摘 要:筛选到一株产 D-泛解酸内酯水解酶的菌株,经鉴定为串珠镰孢霉菌(*Fusarium moniliforme*)SW-902。产酶条件研究表明,用甘油作碳源,蛋白胨作氮源,初始 pH8.0,温度 26℃,摇瓶培养 3d,产酶量最高。在 60L 发酵罐中通风发酵 45h,产菌丝体生物量 7.18g 干菌体/L, D-泛解酸内酯水解酶活力达到 0.92IU/g 干菌体。

关键词: D-泛解酸内酯水解酶,串珠镰孢霉菌 SW-902, D-泛酸

中图分类号: Q556 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 01-0081-07

D-泛酸钙(右旋泛酸钙),为维生素类药物,广泛应用于医药、食品、饲料工业。泛酸作为食品和饲料添加剂的需求量很大。目前世界 D-泛酸钙年产量 6,000~7,000t,年需求量 8,000~10,000t,产品供不应求^[1]。随着食品和饲料工业的发展,需要大规模增加 D-泛酸钙的生产能力和产量。其中的主要技术难题是泛解酸内酯的手性拆分技术。

生产泛酸的传统方法是采用 Stiller 法(异丁醛-甲醛-氰化钠法)或者乙醛酸-异丁醛法合成泛解酸内酯,再将 β -丙氨酸钙与泛解酸内酯直接缩合即得到 DL-泛酸钙^[2~4]。DL-泛酸钙的拆分大都是采用化学法,用手性拆分剂(氰霉素等)拆分或者诱导结晶法拆分等,化学法拆分存在着环境污染严重的问题。国内采用诱导结晶法,工艺已经相当成熟,但是该方法只可以生产泛酸钙,无法用于其他泛酸衍生物如 D-泛醇、D-泛酰巯基乙胺等的生产^[5]。1994 年日本 Sakamoto Keiji 等人报道了用微生物酶法拆分泛酸钙合成中间体泛解酸内酯的方法^[6,7],用微生物酶将 DL-泛解酸内酯拆分得到 D-泛解酸内酯,再与 β -丙氨酸钙缩合生产 D-泛酸钙,认为该方法工艺简单,成本低,从环境角度考虑也有利。

目前已报道能够生产泛解酸内酯水解酶的菌株主要有镰孢霉菌(*Fusarium*),赤霉菌(*Gibberella*),粘帚霉(*Gliocladium*),黑曲属(*Aspergillus*),以及 *Cylindrocarpus*, *Volutella* 等^[7]。我们从实验室保藏和收集的有关霉菌菌株中,筛选到一株具有 D-泛解酸内酯水解活性的镰孢霉菌(*Fusarium* sp.),通过进一步分离、纯化、诱变、鉴定,得到一株串珠镰孢霉菌(*Fusarium moniliforme*)SW-902(CGMCC No.0536)^[8],并且对该菌株进行了产酶条件和酶法拆分泛解酸内酯的研究。

* 国家十五科技攻关项目部分内容(2001BA708B5)

** 通信联系人

作者简介:汤一新(1977-),女,江苏无锡人,1999 届硕士研究生。

收稿日期:2001-05-11,修回日期:2001-07-18

1 材料和方法

1.1 菌种来源

镰孢霉菌(*Fusarium* sp.) SW-9, 从实验室保藏和收集的有关霉菌菌株中筛选。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 20% 马铃薯浸汁 900 mL, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, pH 自然, 定容至 1 L。

1.2.2 种子培养基: 甘油 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 10 g, 玉米浆 10 g, pH 6.0, 定容至 1 L。

1.2.3 发酵培养基: 甘油 20 g, 蛋白胨 8 g, 酵母膏 5 g, 玉米浆 4 g, pH 6.5 ~ 8.0, 定容至 1 L。

1.3 泛解酸内酯和泛解酸的 HPLC 测定

柱型 ZORBAX SBC¹⁸ 5 μ M 250 * 4.6 mm, 流动相为乙腈: 0.02 mol/L KH_2PO_4 = 1:9, 用 HCl 调 pH 到 3, 流速 1 mL/min, 检测波长 215 nm, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$ [9]。

1.4 酶活力测定

在一定条件下, 每分钟水解 1 μ mol D-(-)-泛解酸内酯成 D-(+)-泛解酸的酶量定义为 1 个酶活力单位(IU)。

D-泛解酸内酯水解酶酶活测定方法: 取 10 mL 发酵液, 滤出菌丝体(或 0.1 g 干重的湿菌丝体), 加入 2% 泛解酸内酯(0.2 mol/L) Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L CaCl_2) 2.5 mL, 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 150 r/min 反应 30 min, 抽滤除去菌体, 用 HPLC 分析测定泛解酸的生成量, 并计算每升发酵液或每克干细胞的酶活力单位(IU/L 或 IU/g)。

1.5 生物量测定

取 10 mL 发酵液, 滤出菌丝体, 称湿重, 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h 称干重, 即为发酵液中的生物量, 以 g/L 计。

1.6 菌种鉴定

对照《真菌鉴定手册》, 按渥仑韦柏和莱因钦(Wollenweber & Reinking)的分类系统分类鉴定 [10-12]。

2 结果

2.1 D-泛解酸内酯水解酶产生菌的筛选

2.1.1 产酶菌的筛选: 参照文献报道具有 D-泛解酸内酯水解酶的微生物种属, 从发酵工业生产中收集和本实验室保藏的微生物菌株中, 经初筛、复筛, 获得一株产 D-泛解酸内酯水解酶的镰孢霉菌(*Fusarium* sp.) SW-9, 该菌株产酶稳定, 立体选择性好, 在产酶培养基上摇瓶发酵的菌丝体作酶源, 水解 DL-泛解酸内酯得到的 D-泛解酸, 经内酯化后提取得到的 D-泛解酸内酯光学纯度高, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -47^{\circ}$ 。本方法以该菌作为产酶实验菌株。

2.1.2 镰孢霉菌 SW-9 菌株的鉴定: 观察了该菌的外貌、生长形态、和它的内部结构。在马铃薯或米饭培养基上, 该菌产生大量气菌丝呈棉絮状, 气生菌丝呈白色, 试管反面呈现较淡的紫红色。未见子囊, 有性孢子不详。未见镰刀形大型孢子。在液体培养基中菌体为丝状体, 有隔膜, 有较多小型孢子, 多数孢子单细胞, 圆形, 单生, 未见串生。对照《真菌鉴定手册》, 按渥仑韦柏和莱因钦(Wollenweber & Reinking)的分类系统, 我们初步认为应属于镰孢属中的串珠镰孢霉或稻恶苗霉(*Fusarium moniliforme*)属于赤霉组[Lisola]拟命名

为串珠镰孢霉菌(*Fusarium moniliforme*)SW-9。

2.1.3 产酶菌的诱变:选择串珠镰孢霉 SW-9 为出发菌株,按常规方法进行紫外线、 ^{60}Co 诱变处理。紫外线照射为 15W,距离 27cm,时间 2~3min; ^{60}Co 照射为剂量 2~8 万伦琴,时间为 20~30min。经处理的菌丝体移种到土豆汁琼脂培养基上,25℃培养 3~7d,检出生长好的菌落。

与此同时,将上述诱变和筛选的菌丝体移种到含 D-泛解酸内酯和溴百里酚蓝的筛选培养基上,25℃培养 3~7d,检出变色圈大的生长菌落。

经诱变初筛、复筛,获得一株高产 D-泛解酸内酯水解酶的菌株 SW-902,即串珠镰孢霉菌(*Fusarium moniliforme*)SW-902(CGMCC No.0536)。该诱变株与亲株相比,外观形态一致,但其产酶发酵时间从 7d 缩短到 2~3d,产酶活力提高了 25%,酶转化所需的时间也从 24~48h 缩短到 5~24h。

2.1.4 酶转化产物鉴定:测定酶水解液的液相色谱图,以精制泛解酸内酯及精制泛解酸(由泛解酸内酯水解制备)作为标样。用酶水解反应前后样品作对比。测定结果表明,酶水解反应后,水解液中泛解酸内酯减少,泛解酸从无到有,增加的量与泛解酸内酯的减少有对应关系,如图 1 所示。

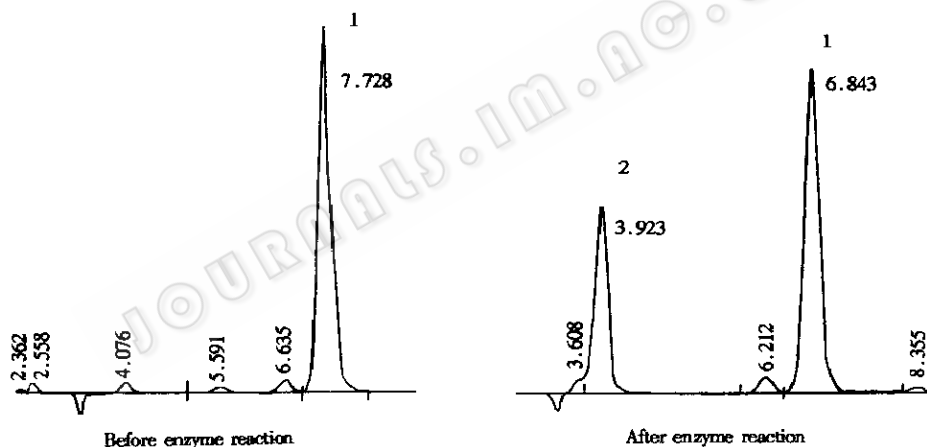


图 1 酶水解前后反应液的液相色谱图

Fig. 1 High-performance liquid chromatography of reaction mixture

1. Pantolactone; 2. Pantoic acid.

先将未水解的泛解酸内酯用溶剂萃取去除,得到已水解的泛解酸溶液,按文献[6]进行泛解酸内酯化反应,再萃取、蒸发、干燥,制备泛解酸内酯干燥结晶样品,用申光 WZZ-2A 自动旋光仪测定该样品的旋光性,计算得比旋光 $[\alpha]_D^{20} = -47.8^\circ$,可确认水解产物是 D-泛解酸内酯。上述结果表明,酶水解产物提取的泛解酸内酯干燥结晶样品为左旋的 D-泛解酸内酯,而且其光学纯度相当高,几乎可以不经重结晶,就能用作生产右旋 D-泛酸钙的中间体。

2.2 D-泛解酸内酯水解酶产生菌的产酶条件

2.2.1 碳、氮源对产酶的影响:分别按 1% 的浓度添加葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘油、

可溶性淀粉、豆油、油酸钠、菜籽油、丙二醇、乙醇等各种碳源,按前述条件摇瓶培养发酵产酶,并测定生物量和酶活,结果如表 1 所示。

用含甘油发酵培养基,按 0.7% 浓度添加硝酸钠、氯化铵、硫酸铵、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、豆饼粉、玉米浆、酪蛋白等各种氮源代替蛋白胨,按前述条件培养产酶,并进行酶转化,结果如表 2 所示。

碳源的初步比较试验表明,甘油对产酶有显著影响,在发酵培养基中,仅加甘油,与加其它碳源相比,表现有相对较高的酶活。氮源试验表明,在含甘油的培养基中,添加蛋白胨,则表现为较高产生物量,酶活也相对较高。同一试验还表明,添加酪蛋白,对产酶有利。

2.2.2 初始 pH 对产酶的影响:进行了不同初始 pH 的发酵试验,分别用 NaOH 或 HCl 调节摇瓶发酵培养基的 pH 值,考察了初始 pH 为 6、7、8、9、10 时的摇瓶产酶情况,结果如图 2 所示:

不同初始 pH 的发酵试验结果表明,培养基初始 pH 不同,对发酵有一定的影响。在 26℃,pH 值为 8.0 时,酶活最高,比较有利于产酶。培养基初始 pH 若偏于中性或酸性,产酶及产菌丝体量均有较大幅度的下降,培养基初始 pH 若高于 8,酶活略有下降,菌丝体上升不明显,所以控制发酵培养基初始 pH 为 8 比较适宜。

2.2.3 温度对产酶的影响:用五台同类型的摇瓶机,分别考察了在 24℃、26℃、28℃、30℃、32℃ 下的摇瓶产酶情况,按上述发酵条件,时间 3d,产酶结果如图 3 所示。

发酵温度试验表明,温度对本课题筛选菌株产酶的影响十分显著。温度高于 26℃,无论产酶活力或者产菌丝体量均明显下降。26℃ 时酶活最高,菌丝体量也比较高。

2.2.4 摇瓶装液量、摇瓶机转速对发酵产酶的影响:用 500mL 三角瓶,分别装发酵培养基 50mL、60mL、80mL、100mL、120mL,各接 5% 种子液,在前述条件下培养,过滤得到湿菌体为粗酶源,各加 25mL 底物测定酶活。其结果如表 3 所示。

表 1 碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of carbon sources on enzyme formation of *Fusarium moniliforme* SW-902

Carbon	Biomass/(g dry cells/L)	Activity/(IU/L)
Glucose	3.39	6.04
Fructose	4.54	5.29
Sucrose	3.82	5.74
Maltose	4.08	6.29
Glycerol	4.49	6.32
Soluble starch	3.49	5.83
Bean oil	3.16	5.65
Sodium oleate	1.34	1.45
Rape oil	4.96	3.87
Propanediol	3.53	4.99
Ethanol	3.36	5.74

表 2 氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on enzyme formation of *Fusarium moniliforme* SW-902

Nitrogen sources	Biomass/(g dry cells/L)	Activity/(IU/L)
NaNO ₃	2.21	6.35
NH ₄ Cl	1.69	5.68
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.02	4.32
Peptone	2.88	7.08
Yeast extract	2.34	4.93
Beaf extract	2.15	5.74
Oil meal	4.23	6.13
Corn steep liquor	2.58	4.32
Casein	3.59	7.40

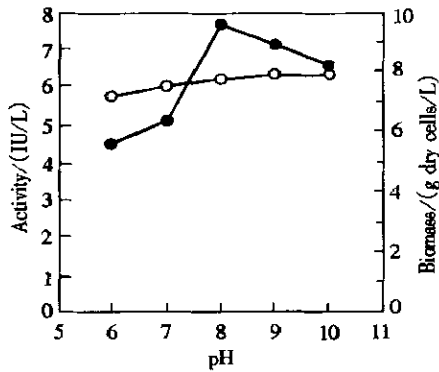


图 2 初始 pH 对产酶的影响

Fig.2 Effect of initial pH on enzyme formation of *Fusarium moniliforme* SW-902

—●— Activity; —○— Biomass.

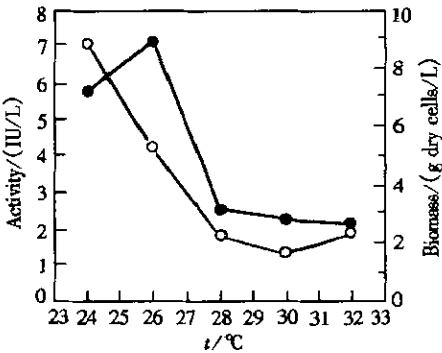


图 3 温度对产酶的影响

Fig.3 Effect of incubate temperature on enzyme formation of *Fusarium moniliforme* SW-902

—●— Activity; —○— Biomass.

表 3 摇瓶装液量对发酵产酶的影响

Table 3 Effect of medium volume on enzyme formation

Medium volume/mL	Biomass/(g dry cells/L)	Activity/(IU/L)
50	7.10	6.62
60	7.63	6.78
80	7.76	7.28
100	8.60	6.87
120	8.57	7.11

表 4 摇瓶机转速对发酵产酶的影响

Table 4 Effect of rotating speed on enzyme formation

Rotating speed/(r/min)	Biomass/(g dry cells/L)	Activity/(IU/L)
150	7.05	6.54
200	8.60	6.87

用 500mL 三角瓶,装发酵培养基 100mL,分别置于不同转速的同类型摇瓶机中,按前述条件培养、测定,结果如表 4 所示。

表 3、表 4 显示,装液量试验与转速试验结果差别不显著,说明通氧量对摇瓶发酵产酶影响不大。

2.3 60L 发酵罐产酶试验

用 60L 不锈钢搅拌发酵罐进行试验。发酵罐装液量 40L,接种量 5%,搅拌转速 350r/min,通气量 40L/min,温度 26℃,消泡剂 0.025%,发酵曲线如图 4 所示。

由 60L 发酵罐发酵时间曲线看出,发酵比较稳定,20~40h 酶活已经达到 5~7IU/L,产酶较为稳定,45h 达到产酶高峰 (7.18g 干菌体/L, 6.62IU/L, 0.92IU/g 干菌体)。但放罐时 (50h)随着 pH 值的下降,酶活有所下降,确定发酵已到终点。在此基础上,又进行了 1000L 发酵罐产酶发酵实验,也获得比较满意的结果。

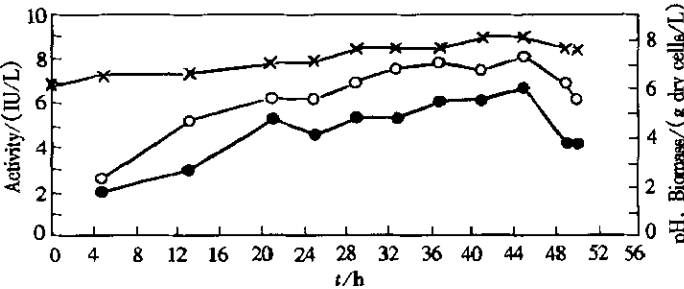


图 4 60L 发酵罐产酶时间曲线

Fig.4 Time course of enzyme formation in 60L fermenter

—●— Activity; —○— Biomass; —x— pH.

3 讨论

生物拆分制备 D-泛解酸内

酯方法研究已十多年。生物法拆分主要有酶法,微生物法。已报道的研究有多种技术路线。如 Kamata Akira 用微生物彻底分解 DL-泛解酸内酯中的 L-泛解酸内酯,得到未分解的 D-构型泛解酸内酯,此方法的缺点是至少损失一半 DL-泛解酸内酯原料^[13]。Yamada Hideaki 等用微生物氧化 DL-泛解酸内酯中的 L-构型泛解酸内酯或酮基泛解酸内酯,再用不对称还原方法转化为 D-泛解酸内酯^[14,15],由于基质浓度低、反应速率低,尚未有实用价值。Yamada Hideaki 等用微生物选择性地不对称水解 DL-泛解酸内酯中的 L-泛解酸内酯,可直接得到未水解的 D-泛解酸内酯^[16]。但此方法只有 DL-泛解酸内酯中的 L-构型的内酯水解非常彻底,才能得到高光学纯度的 D-泛解酸内酯。这样,对酶及其酶解条件要求很高,反应时间也长,还可能因长时间反应带来化学水解引起其他杂质。Sakamoto Keiji 等人用尖镰孢霉(*Fusarium oxysporum*)选择性地不对称水解 DL-泛解酸内酯中的 D-泛解酸内酯,得到 D-泛解酸,用分离后的 D-泛解酸进行内酯化,可生成高光学纯度 D-泛解酸内酯^[6,7]。该方法虽然水解率不高(30%左右),但未水解的 L-泛解酸内酯可消旋后再利用。日本第一制药从 1998 年起用生物技术方法拆分大规模生产 D-泛酸钙(Chemical Market Reporter, 23 Aug 1999, Vol 256, Iss 8, p19)。另外还有一些其他酶法、微生物法拆分的报道,如:脂肪酶或酰氨酶水解泛酸酯或泛酸酰氨^[17,18]、用羟肟水解酶(氧肟酶)的醛醇的不对称氰醇化路线^[19,20]等。

本论文采用了与日本 Sakamoto Keiji 等人相同的技术路线,从发酵工业生产中收集、保藏的微生物菌株中,经初筛、选育,获得了一株产 D-泛解酸内酯水解酶的串珠镰孢霉菌(*Fusarium moniliforme*.)SW-902,该菌株产酶发酵时间短(2~3d),产酶稳定,立体专一性好(即不水解 L-泛解酸内酯)。研究了用发酵生产的菌丝体作酶源,水解 DL-泛解酸内酯中的 D-泛解酸内酯,分离得到 D-泛解酸,再经过内酯化反应,可得到很高光学纯度的 D-泛解酸内酯。酶水解时间短(5~24h),不要求反应彻底,未水解部分经过消旋化可反复使用。用菌丝体作酶源,可反复利用多次(6 次以上),用卡拉胶进行固定化后,反复分批酶转化可达 30 次以上(另文发表)。总之,微生物 D-泛解酸内酯水解酶的方法被认为是很有前景的方法,符合实用性要求。

参 考 文 献

- [1] 周楠玉,王志峰.现代化工,1999,19(3):42~43.
- [2] 王太文.精细化工,1998,3:15~18.
- [3] 刘丽秀,范鲁娜.湖南化工,1999,29(4):13~15
- [4] 袁桂梅.山东化工,1998,2:44~45.
- [5] 陈冠荣主编.化工百科全书.第 16 卷.北京:化学工业出版社,1997.831~837.
- [6] Sakamoto K, Yamada H, Shimizu S. US Patent, 5,275,949,1994.
- [7] Kataoka M, Shimizu K, Sakamoto K, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44:333~338.
- [8] 孙志浩.中国专利,01104070.X,2001.
- [9] 中国食品添加剂生产应用工业协会编.食品添加剂分析检验手册.北京:中国轻工业出版社,1999.286~287.

- [10] 魏景超遗著. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 609 ~ 638.
- [11] 拉依洛著. 王云章等译. 镰刀菌. 北京: 科学出版社, 1958.
- [12] 张素轩. 真菌学报, 1991, 10(2): 85 ~ 94.
- [13] Kamata A. JP, 62, 294, 096, 1987.
- [14] Yamada H, Shimizu A, Hata H. JP, 61, 293, 386, 1986.
- [15] Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(1): 177 ~ 182.
- [16] Morya T, Miki K, Hikichi J, et al. JP, 04, 234, 995, 1992.
- [17] Glaenzer B I, Faber K, Griengl H. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 10(11): 689 ~ 690.
- [18] Fuelling G, Schudok M. DE, 4, 005, 150, 1991.
- [19] Effenberger F, Eichhorn J, Roos J. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, 6(1): 271 ~ 282.
- [20] Effenberger F, Eichhorn J, Roos J. DE, 19, 506, 728, 1996.

Production of D-pantolactone Hydrolase by *Fusarium moniliforme* SW-902

Tang Yixin¹ Sun Zhihao^{1*} Hua Lei¹ Guo Xinfu² Wang Jun²

(¹ School of Biotechnology, Southern Yangtze University,

Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036, China)

(² Zhejiang Xinfu Biochemistry Ltd. Co., Hangzhou 311301, China)

Abstract: *Fusarium moniliforme* SW-902, a high-yielding strain for producing D-pantolactone hydrolase was screened. The conditions for enzyme formation of the strain were studied. The suitable carbon source of the medium was glycerol and the suitable nitrogen source was peptone. The optimum temperature and initial pH for enzyme formation were 26 °C and pH 8.0 respectively. When the organism was cultured in the 60L-fermentor under the optimum conditions for 45h, about 7.18g dry cells/L and 0.92 IU/g dry cells weight were obtained.

Key words: D-pantolactone hydrolase, *Fusarium moniliforme* SW-902, D-pantothenic acid